

УДК 616.921-06:616-018.74-008.6:615.272.4
DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.2533178>

О. І. Верещагіна, Є. В. Нікітін, Є. А. Потапов

**ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК ПРОЦЕСІВ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕННЯ ТА
АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ З ДИСФУНКЦІЄЮ ЕНДОТЕЛІЯ
У ХВОРИХ НА ГРИП А**

Одеський національний медичний університет

Summary. Vereshchagina O. I., Nikitin E. V., Potapov Ye. A. **INTERACTION WITH THE PROCESSES OF FREE-RADICAL OXIDATION AND ANTIOXIDANT PROTECTION WITH ENDOTHELIUM DYSFUNCTION IN PATIENTS WITH INFLUENZA A.** - *Odessa National Medical University, e-mail: vereshchagina8@gmail.com.* - **The objective:** to determine the role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of influenza A and the impact on its development of disorders in the system of lipid peroxidation and antioxidant protection against influenza.

Key words: desquamated endothelial cells, endothelial dysfunction, ceruloplasmin, nitric oxide.

Реферат. Верещагіна А. И., Никитин Е. В., Потапов Е. А. **ВЗАЕМОСВЯЗЬ ПРОЦЕССОВ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ И АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ С ДИСФУНКЦИЕЙ ЭНДОТЕЛИЯ У БОЛЬНЫХ ГРИППОМ А.** Цель исследования: изучить роль эндотелиальной дисфункции в патогенезе гриппа А и влияние на ее развитие нарушений в системе ПОЛ, а также влияние антиоксидантной защиты на течение гриппа.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, антиоксидантная защита, дисфункция эндотелия, циркулирующие эндотелиальные клетки.

Реферат. Верещагіна О. І., Нікітін Є. В., Потапов Є. А. **ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК ПРОЦЕСІВ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕННЯ ТА АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ З ДИСФУНКЦІЄЮ ЕНДОТЕЛІЯ У ХВОРИХ НА ГРИП А.** Мета дослідження: визначити роль ендотеліальної дисфункції в патогенезі грипу А та впливу на її розвиток порушень у системі перекисного окислення ліпідів, а також антиоксидантного захисту на перебіг грипу.

Ключові слова: перекисне окислення ліпідів, антиоксидантний захист, дисфункція ендотеліа, циркулюючі ендотеліальні клітини.

Вступ

Грип є найбільш поширеним та масовим інфекційним захворюванням в усьому світі. Постійні спостереження за грипом свідчать про те, що епідемічний процес при цій інфекції має безперервний перебіг, охоплюючи населення різних територій та різних країн [3, 8, 13, 18].

Дослідження патогенетичних порушень, при грипі з метою розробки ефективних методів противірусної терапії та фармакологічної корекції станів, що виникають, набуло особливої актуальності за останні роки у зв'язку з появою нових реасортантних штамів, здатних викликати пандемії.

Прискорення перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) починається з моменту проникнення вірусу у організм і є пусковим моментом в розвитку багатьох порушень з боку

усіх органів та систем. Неспроможність антиоксидантної системи має велике значення в патогенезі грипу, особливо у хворих на тяжкий грип [1, 15, 20]. Можливість виникнення вільнорадикального окислення (ВРО) у респіраторному тракті обумовлена безпосереднім контактом з киснем, морфологічними і функціональними особливостями легень [5, 19]. Важливе місце серед антиоксидантного захисту (АОЗ) клітини займає система глутатіону, компоненти якої приймають участь як в ензиматичних (глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіонтрансфераза), так і в неензиматичних (відновлений глутатіон) реакціях АОЗ [8, 9]. Інтенсивність ПОЛ є важливішим фактором, який регулює роботу імунної системи, гальмує чи прискорює запальні процеси, а формування вільних радикалів - важливий захисний механізм, що лежить в основі неспецифічного імунітету - фагоцитозу. Нормалізуюча дія антиоксидантів на фактори імунітету обумовлена дією на мембрани клітин, у тому числі імунокомпетентних клітин [5, 9].

Однією з особливостей інфекційного процесу при грипі А H1N1/09 вважається пошкодження ендотелію, як первинне – безпосередня інвазія вірусу у клітини, так і вторинне – у разі активації протизапальних цитокінів [4, 8]. На клітинному рівні дисфункція ендотелію (ДЕ) пов'язана з ураженням та прискоренням апоптозу ендотеліоцитів. В залежності від морфологічних змін дескамованого ендотеліоциту, умовно виділяють 3 стадії апоптозу: початкову, стадію виражених змін та кінцеву. В ендотеліоцитах синтезуються біологічно активні речовини, які контролюють апоптоз, але під впливом вірусу грипу, що має ендотеліотропні властивості, процес прискорюється та розвивається дисфункція ендотелію. Важлива роль у забезпеченні ефективного функціонування ендотеліальної системи, судинного та мікроциркуляторного гомеостазу, а також запобіганні розвитку ендотеліальної дисфункції належить оксиду азоту [11, 12, 16].

В доступній літературі з'являються роботи, в яких досліджуються роль ДЕ при інфекційних захворюваннях та при тяжкому грипі, але вони мають поодинокий та розрізнений характер [6].

Визначення стану процесів ПОЛ та АОЗ разом з дослідженням комплексу маркерів ДЕ у сироватці крові хворих на грип А залежно від тяжкості захворювання має вагомое діагностичне та практичне значення. Також застосування патогенетично обґрунтованих методів фармакологічної корекції з урахуванням ДЕ, а також порушень процесів ПОЛ та АОЗ при грипі дозволить поліпшити результати лікування.

Матеріали та методи

Під спостереженням знаходилось 158 пацієнтів, хворих на грип А, з них – у 32 був легкий перебіг, 62 - середньо тяжкий та 64 хворих - з тяжким грипом у віці від 18 до 45 років. Критеріями виключення були вагітність, тяжка соматична патологія та ожиріння. Дослідження проведене на базі клінічної інфекційної лікарні м. Одеса. Ступінь тяжкості визначали за клінічними проявами та наявністю ускладнень.

Діагноз грипу встановлювався на підставі епідеміологічних, клінічних та вірусологічних методів дослідження. У дослідження включали тільки хворих з позитивним результатом змивів з носоглотки методом полімеразної ланцюгової реакції на грип А.

Були проведені традиційні методи обстеження (загальний аналіз крові та сечі, біохімічне дослідження крові, рентген органів грудної клітини). З метою оцінки маркерів ЕД у сироватці крові хворих визначали вміст сумарного рівня стабільних метаболітів оксиду азоту (NOx), нітратів та нітритів (NO₂+NO₃) за допомогою реактиву Грісу; активність церулоплазміну (ЦП) методом, заснованим на окисненні п-фенілендіаміну, на спектрофотометрі «ApeL PD-303UV» Японія [7, 12]. Визначали інтенсивність десквамації ендотелію за модефікованим методом J. Hladovec з визначенням загальної кількості циркулюючих ендотеліальних клітин (ЦЕК) та їх кількість на різних стадіях апоптозу [10, 14, 17]. Визначали стан процесів ПОЛ: діє нових кон'югатів (ДК), кетодієнів (КД) та малонового діальдегіду (МДА), які широко використовуються в якості критеріїв інтенсивності даного процесу. Концентрацію ДК та МДА в сироватці крові хворих на грип, а також глутатіонпероксидази (ГП), глутатіонредуктази (ГР) і глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г-6-ФДГ) визначали за загальноприйнятими методиками [9].

Вище означені дослідження проводили під час надходження хворих до стаціонару та на 5 день спостереження.

Пацієнти були розподілені на наступні групи: I група - 31 хворий на легкий грип, II група - 64 хворих на грип середньої тяжкості та III група - 62 хворих на тяжкий грип з

нетяжкою пневмонією. З метою контролю отриманих результатів дослідженні практично здорові добровольці - 30 осіб, що дали інформовану згоду щодо обстеження.

Статистичну обробку одержаних результатів здійснювали на персональному комп'ютері за допомогою пакетів STATISTICA 10.0, MedCalc 14.8.1 и MicrosoftExcel 2010 с надстройкою AtteStat 12.5, інтернет-калькуляторів SISA – Simple Interactive Statistical Analysis (<http://www.quantitativeskills.com/sisa/>) и WebPagestat Perform Statistical Calculations (<http://statpages.info>).

Результати та їх обговорення

Проведені дослідження показали, що в групі контролю загальна кількість десквамованих ендотеліальних клітин у плазмі крові становила 700-1300 клітин/мл. В групах дослідження виявлено зростання рівню циркулюючих ендотеліальних клітин (ЦЕК) залежно від тяжкості захворювання (табл. 1). Так, у хворих на грип I групи загальна кількість клітин становила 1300-1600 з переважанням вираженої стадії апоптозу, в II - й – 1700 - 2400, з максимумом у III групі – 2500 - 3900, що відповідало I ступеню ендотеліальної дисфункції (2500 клітин/мл). На нашу думку, зростання загальної кількості ЦЕК у хворих на грип А з переважанням вираженої стадії апоптозу свідчить про гостре ушкодження ендотелію судин у хворих с перших днів захворювання, а також про значну мембранодеструктивну дію токсинів грипу А та інших механізмів ушкодження ендотелію (рис. 1):

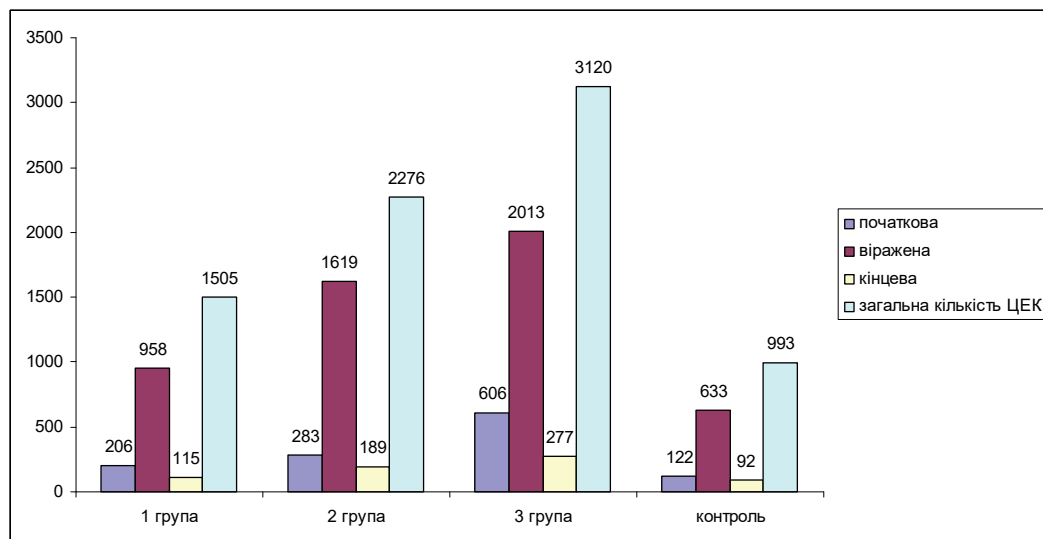


Рис. 1. Вміст ендотеліальних клітин з розподіленням за стадіями апоптозу в сироватці крові хворих на грип

Дослідження стадій апоптозу десквамованих зі стінок судин та мігруючих у кров ендотендотеліальних клітин показали, що на фоні зростання загальної кількості ендотеліоцитів зростала й відносна кількість клітин з вираженою стадією апоптозу особливо у хворих II та III групи дослідження, але в порівнянні з контролем, збільшення кількості клітин з початковою стадією апоптозу свідчить про збільшення ступеню десквамації (0-300 до 400-800). За даними досліджень [11], підвищення ЦЕК на кінцевій стадії апоптозу вірогідно пов'язано зі зниженням швидкості утилізації десквамованого ендотелію у хворих на грип А.

Виявлено прямий сильний кореляційний зв'язок між періодом розпаду грипу та враженістю морфологічних і функціональних порушень ендотелію. Ступінь ураження клітин ендотелію корелює з зростанням кількості ЦЕК у периферичній крові. Кількість ЦЕК має прямий сильний зв'язок з тяжкістю грипу (коефіцієнт кореляції Спірмена $r = 0,72$, $p < 0,001$).

За даними дослідження, гострий період грипу А супроводжується достовірною інтенсифікацією процесів ліпопероксидації у вигляді підвищення концентрації дієнових кон'югатів, кетодієнів та МДА в сироватці крові, в групах дослідження та пригніченням

антиоксидантної системи ГП, ГР, та особливо G-SH (табл. 1).

Таблиця 1

Стан системи ПОЛ та АОЗ у хворих на грип залежно від тяжкості

Показник	Контроль n=30	Легкий грип N=31	Середньотяжкий грип n=62	Тяжкий грип n=64
МДА мкМ/л	0,97±0,099	1,68±0,2*	1,76±0,45*	2,83±0,05*
ДК+КДС, Ед/мг липидов	0,013±0,004	0,02±0,003*	0,03±0,008*	0,05±0,007*
ГР мкМ НАДФН2/мг гемогл/мин	0,581±0,056	0,385±0,04	0,385±0,094	0,38±0,01
ГП ммоль/мг гемогл /мин	0,152±0,023	0,13±0,01	0,101±0,020	0,11±0,004
G-SH	128,9±16,4	101,7±7,38*	94,23±17,54*	61,28±2,75*
Г-6-ФД мкМ НАДФН2/мг гемогл/мин	0,129±0,016	0,098±0,006	0,09±0,016	0,08±0,004

* Значимість відмінностей з контрольною групою <0,05

Для дослідження функціонального стану ендотелію у хворих на грип А визначали показники ЦП та вміст сумарного рівня стабільних метаболітів оксиду азоту (NO2+ NO3) (табл. 2):

Таблиця 2

Показники ЦП та NO у хворих на грип залежно від тяжкості перебігу

Показники	Група контролю n=30	Перебіг грипу		
		Легкий n=31	середньої тяжкості n=62	тяжкий грип n=64
ЦП мг/л	127,4±9,42	138,4±3,3*	152,7± 2,5*	174,5±3,3*
NO2+ NO3 мкмоль/л	25,97±1,89	28,7±2,7	41,2± 3,7*	77,2±0,8*

* Значимість відмінностей з контрольною групою <0,05

Як видно з наведеної вище таблиці, виявлено достовірне підвищення концентрації церулоплазміну у сироватці крові хворих обох груп I (152,7±12,3) та II (151,24±16,4) порівняно з групою контролю (127,4±9,42). Високий рівень ЦП у хворих на грип, на наш погляд, відображає підвищення активності клітин ендотелію та свідчить про активізацію процесів ліпопероксидації. Також встановлено достовірне підвищення вмісту сумарного рівня стабільних метаболітів оксиду азоту (NO2+ NO3) незалежно від тяжкості захворювання з достовірним підвищенням концентрації у хворих II (41,2±3,7) та III (77,2±0,8) груп.

Таким чином, ступінь ураження клітин ендотелію корелює з зростанням кількості ЦЕК у периферичній крові та підвищенням концентрації NO в сироватці крові.

За даними літератури, під впливом токсинів вірусу грипу А відбувається активація та ушкодження клітин ендотелію судин. Компенсаторне підвищення концентрації оксиду азоту у сироватці крові можливо є захисною реакцією у відповідь на інфекційне захворювання, що направлене на елімінацію збудника та зберігання тромборезистентності стінки судин. Однак підвищення концентрації NO у сироватці крові може підвищувати його цитопатичні властивості, які подібні впливу активних форм кисню, що сприяє ушкодженню клітин ендотелію, їх апоптозу і виходу у кров'яне русло.

Виявлено прямий сильний кореляційний зв'язок між періодом розпаду грипу, вираженістю морфологічній і функціональних порушень ендотелію та підвищенням рівню NO в сироватці крові. Підвищення кількості ЦЕК у периферичній крові корелює зі зростанням сумарних метаболітів азоту NOx (NO₂+ NO₃) у периферичній крові (коефіцієнт кореляції Спірмена $r=0,77$, $p<0,001$).

Своєчасна діагностика ДЕ на ранніх етапах захворювання та призначення патогенетичної терапії сприяє його ремодулюванню та профілактиці ускладнень.

Висновки

1. При грипі уражаються клітини ендотелію судин. Поява циркулюючих ендотеліальних клітин у периферичній крові є прямим маркером ушкодження ендотелію і свідчить про участь ендотеліальної дисфункції в патогенезі грипу.
2. Грип супроводжується активацією перекисного окислення ліпідів з одночасним пригніченням системи антиоксидантного захисту.
3. У хворих на грип, незалежно від тяжкості хвороби, спостерігається гіперпродукція оксиду азоту та церулоплазміну.

Література:

1. Діброва Ю. В. Ретроспективна оцінка епідемії грипу А (H1N1) в Україні з позиції патолога. *Лікарська справа*. 2015. № 1/2. С. 55–58.
2. Жаринова В. Ю. Эндотелиальная дисфункция как мультидисциплинарная проблема. *Кровообіг та гемостаз*. 2015. № 1 –2. С. 9 – 15.
3. Задорожна В. І., Сергєєва Т. А., Некрасова Л. С. Нові віруси грипу та пов'язані з ними ризики. *Журнал АМН України*. 2016. Т.16, № 1. С.45 –55.
4. Йосик Я. І. Прозапальні і протизапальні цитокіни у хворих на гострі респіраторні вірусні і інфекції. *Вісник наукових досліджень*. 2014. № 1. С. 11–14.
5. Калматов Р. К. Роль механизмов свободнорадикального окисления в патогенезе локального поражения верхних дыхательных путей. *Молодой учёный*. 2015. № 10 (90). С. 417– 422.
6. Картополова Е. В. Патогенетическое значение оксида азота в развитии гемодинамических нарушений при гриппе: дис. на соискание уч. степ. канд. мед. наук. Челябинск, 2018. 140 с.
7. Куценко Л. А., Кайдашев И. П. Место церулоплазмينا среди белковострой фазы как маркера системного воспаления / Куценко Л.А., Кайдашев И. П. // Лабораторная диагностика. – № 3 (57). 2011. С. 59 –68.
8. Мироманова Н. А. Состояние процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы у детей при гриппе PDM09. *Журнал инфектологии*. 2014. Т. 6, № 1. С. 29–34.
9. Нікітін Є. В., Сервецький К. Л., Верба Н. В. Клініко-патогенетичне значення стану перекисного окислення ліпідів та ферментативної антиоксидантної системи у хворих на гострий гепатит В. *Гепатологія*. 2014. № 2. С. 29 – 41.
10. Спосіб визначення ендотеліальної дисфункції. Патент на корисну модель № 125773. Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні моделі 25.05.2018. Дата публікації відомостей про видачу патенту та номер бюлетеня: 25.05.2018 Шафран Л.М., Третьякова О. В., Потапов Є. А.
11. Характеристики ендотеліальної дисфункції у хворих на цукровий діабет / Кузнецова А. С., Кузнецова К.С., Біць Т. Н., Кузнецова О.М., Демидов С. М., Поветкина Т. Н., Гоженко А. І. *Актуальные проблемы транспортной медицины*. 2018. № 2 (52). С.116 – 122.
12. Эндотелиальная дисфункция в патогенезе комбинированного действия компонентов полимерных материалов / Е. В. Третьякова, Л. М. Шафран, В. Н. Почтарь, Е. А. Потапов. *Biomedical and biosocial anthropology*. 2017. № 29. С. - 83-89.
13. A(H1N1)pdm09 dominant influenza strain in Europe: mid-season risk assessment / European Centre for Disease Prevention and Control [Електронний ресурс] URL: http://ecdc.europa.eu/en/press/news/_layouts/forms/News_DispForm.aspx?List=8db7286c-fe2d476c-9133-18ff4cb1b568&ID=1354#sthash.JSOpjhFw.dpuf.

14. Circulating endothelial cells in coronary artery disease / Lampka M., Grbczewska Z., Jendryczka-Mackiewicz E. et al. *Kardiologia Polska*. 2010. Vol. 68, № 10. P. 1100-1105.
15. Characteristics and outcome of ill critical patients with influenza A infection / Bouneb R., Mellouli M., Bensoltane H. et al. *Pan. Afr. Med. J.* 2018. Vol. 26, № 29. P. 174.
16. Cooce J., Losordo D. Nitric oxide and angiogenesis. *Circulation*. 2002. Vol. 105. P. 81-96.
17. Hladovec J. Circulating endothelial cells as a sign of vessel wall lesions. *Physiol. Bohemoslov.* 1978. Vol. 27, № 2. P. 140-144.
18. Neumann G., Kawaoka Y. The first influenza pandemic of the new millennium. *Infl. Oth. Resp. Vir.* 2011. Vol. 5, № 3. P. 157-166.
19. Pober J. S., Sessa W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2007. Vol. 7. P. 803-815.
20. The induction and consequences of Influenza A virus-induced cell death / Atkin-Smith G. K., Duan M., Chen W., Poon I. K. H.. *Cell Death Dis.* 2018. Vol. 9, № 10. P. 1002.

References:

1. Dibrova Yu.V. Retrospective evaluation of the influenza A (H1N1) epidemic in Ukraine from the pathologist's point of view. Medical case. 2015. No. 1/2. Pp. 55-58.
2. Zharinova V. Yu. Endothelial dysfunction as a multidisciplinary problem. Blood circulation and hemostasis. 2015. № 1 -2. Pp. 9 - 15
3. Zadorozhnaya VI, Sergeeva T. A., Nekrasova L. S. New influenza viruses and associated risks. Journal of the Academy of Medical Sciences of Ukraine. 2016. T.16, No. 1. P.45 -55.
4. Yosik Ya. I. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in patients with acute respiratory viral infections and infections. Bulletin of scientific research. 2014. No. 1. S. 11-14.
5. Kalmatov R. K. The role of mechanisms of free radical oxidation in the pathogenesis of local upper respiratory tract damage. Young scientist 2015. No. 10 (90). 417-422.
6. Kartopolova EV Pathogenetic value of nitric oxide in the development of hemodynamic disorders in influenza: dis. to acquire a student steppe. Cand. honey. sciences Chelyabinsk, 2018. 140 p.
7. Kutsenko L. A., Kaidashev I.P. Location of ceruloplasmin among proteinuria phase as a marker of systemic inflammation / Kutsenko L.A., Kaidashev I.P. // Laboratory diagnostics. - No. 3 (57). 2011. P. 59-68.
8. Miromanova NA The state of processes of lipid peroxidation and antioxidant system in children with influenza PDM09. Journal of Infectiology. 2014. T. 6, No. 1. S. 29-34.
9. Nikitin EV, Servetsky K. L., Verba N. V. Clinical and pathogenetic value of the state of lipid peroxidation and enzymatic antioxidant system in patients with acute hepatitis B. Hepatology. 2014. No. 2. S. 29-41.
10. Method of determination of endothelial dysfunction. Patent for Utility Model No. 125773. Registered in the State Register of Patents of Ukraine on utility models on 05/25/2018. Date of publication of information about the issuance of a patent and the issue number: 05/25/2018 Saffran LM, Tretyakova O.V., Potapov Ye.A.
11. Characteristics of endothelial dysfunction in patients with diabetes mellitus / Kuznetsova AS, Kuznetsova KS, Bits T. N., Kuznetsova OM, Demidov SM, Povetkin T. N., Gozhenko A. I. Actual problems of transport medicine. 2018. No. 2 (52). P.116 - 122.
12. Endothelial dysfunction in the pathogenesis of the combined action of components of polymeric materials / EV Tretyakova, L. M. Saffran, V. N. Poshtar, E. A. Potapov. Biomedical and biosocial anthropology. 2017. No. 29. S. - 83-89.

Робота надійшла в редакцію 03.12.2018 року.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування